

# 免疫担当細胞の抗原受容体シグナルの発火機構は

## どこまでわかったか

### -CD45 によるサークファミリーキナーゼの活性化機構解明の現状-

片桐達雄

#### はじめに

全速力で走り続けていられないのと同様、我々の身体を構成する 60 兆個の細胞達は常に活発に稼働しているわけではない。普段、多くの細胞は、むしろアイドリング状態にあって、何かのきっかけでアクセル・オンの状態、すなわち活性化状態に切り替わる。我々の生活環境には常に多くの病原微生物が共存しているので、こと免疫系の細胞におけるこの活性化スイッチのオン/オフは、個体の生存維持に極めて重要である。免疫系の主役である T 細胞や B 細胞は、外来異物をそれぞれ T 細胞抗原受容体と B 細胞抗原受容体と呼ばれるタンパク質で認識することで、細胞の活性化スイッチが頻繁に点灯/消灯している。我々、免疫学者の興味は、この分子スイッチの仕組みがどのように構築されているのかを知ることである。

近代免疫学は、この初期のスイッチボックスの仕組みをとりあえず棚上げして、その次に起こること、そしてさらに次に起こること、そしてさらに…という過程で、シグナル伝達系の仕組みを次々と解明してきた。そして、「次に起こる反応」については多くの理解を得た。しかし、現在でも、スイッチボックスそのものは以前として、ブラックボックスのままである。つまり、テレビのリモコンの操作法はよくわからないのだけれどもとりあえずなんとなく観ることができる、という状態が我々の現状である。もちろん、最新の研究成果から、このリモコンスイッチが単にオン・オフの機能のみでなく、微妙なボリュームのセッティングや各種チャンネルの切り替え機能を有していることがわかっており、使い方もわかりつつある。もっと、この仕組みを詳細に理解すれば、もっと人類に快適な免疫制御が出来るはずだという期待は高まっている。本稿は、このような背景の元、免疫細胞のスイッチボックスについて、現在の研究の進展状況を紹介することを目的とする。特に、今までに最も理解が進んでいる CD45 と呼ばれるチロシン脱リン酸化酵素 (PTP) がどのようなメカニズムでスイッチボックスのオン/オフを制御しているのかについて概説を試みようと思う。

#### 1. リンパ球活性化スイッチボックスとシグナル伝達の概要

はじめにリンパ球活性化の初期シグナルについて概説する。免疫担当細胞の細胞膜にあるスイッチボックスの最初のパーツは抗原受容体タンパク質そのものである。このタンパク質自体には、シグナル伝達に関わる酵素活性を持たない。その代わりに、シグナル伝達専門の酵素タンパク質を近傍に従えており、さらに、その酵素タンパク質の基質となるタンパク質をも従えた複雑な複合体を細胞膜に形成して存在している。こ

の複合体がスイッチボックスとしての機能を担っているのである。ここに含まれる独自の酵素タンパク質とは、サークファミリーというカテゴリーに属するタンパク質リン酸化酵素 (src family kinase = SFK) である。数年前まで、リンパ球独自の SFK の活性化がスイッチボックスの第一のトリガーと考えられていた。しかし、最近では、さらに SFK の上流に、SFK の活性をコントロールする脱リン酸化酵素 (protein tyrosine phosphatase = PTP) があり、これが実は第一のトリガーであることが明らかになってきた。この詳細は後述することにして、とりあえず、この複合体で形成されるシグナル伝達の概略を図 1 に描いてみた<sup>1-3)</sup>。ここに示すように複合体は、抗原と直接結合する抗原受容体分子とこれに寄り添うように存在している会合タンパク質を中心として構成されており、T 細胞<sup>2)</sup>と B 細胞<sup>4)</sup>、そしてマスト細胞の受容体<sup>5)</sup>においては、その集団を構成する個々の主要分子については、すでにほとんど明らかになったと信じられている<sup>1-4)</sup>。ゲノムプロジェクトの終了に伴い、新たなパーツを探し出す作業よりも、すでに知られている各パーツが、如何に特定の空間で、如何に相互作用するかが最新サイエンスの潮流となってきたのである。さて、現在広く受け入れられている教科書的な学説にしたがって、図 1 は「2. SFK の活性化」からスタートしている。これ以降のシグナルは、SFK が種々の基質をリン酸化するが、特に ITAM モチーフ<sup>6)</sup>と呼ばれる特別な構造内のチロシン残基がリン酸化されることが出発点となっている。そして、これより下流にシグナルが伝わり、種々のタンパク質のリン酸化、カルシウムシグナル、リン脂質代謝回転等が誘導され、最終的に細胞増殖、抗体タンパクの産生あるいはアポトーシスが誘導される。<sup>1-3)</sup>

本稿では、最終的に図 1 における「1. ???」の仕組みがどこまでわかってきたかについて概説するの主眼であるが、その前に src family kinase の活性制御機構についての理解が必須であるため、まずそちらから始めよう。

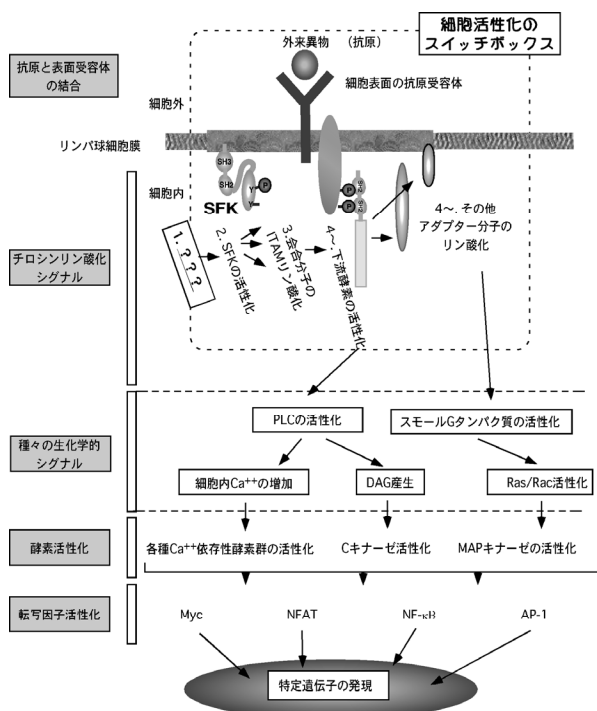


図1. 細胞活性化スイッチボックスと抗原受容体シグナル伝達伝達の概略モデル

外来異物 (抗原) が受容体と結合すると、本文中で後述する機構により、SFK の活性化が起こる。SFK は基質となるシグナル伝達下流酵素を介して、スイッチボックスに含まれる別のタンパク質に存在する ITAM モチーフをリン酸化する。(ITAM とは immunoreceptor tyrosine-based activation motif: リン酸化されると細胞が活性化方向に働くタンパク質の部位) リン酸化された ITAM にさらに下流の酵素がリクルートする。その酵素は、さらに SFK によってリン酸化されて活性化し、アダプター分子をリン酸化する。このようなシグナル伝達上流のイベントにより、シグナルは細分化するが、遺伝子発現直前では、転写因子活性化というイベントを介して収束し、その細胞独自の生物学的応答を引き起こすのである。

## 2. リンパ球活性化スイッチボックスの構成パーツとしての SFK

SFKは図 2A に示すような共通構造を持っており、分子中に酵素活性に影響をもたらすチロシン残基が C 末端 (C 部位) とキナーゼ活性ドメイン内 (A 部位) の 2 カ所に存在する<sup>7-9)</sup>。それぞれのチロシン残基はリン酸化されることによって逆の影響を与える。すなわち、C 部位がリン酸化されると酵素活性を抑制し、A 部位のリン酸化は酵素活性の増大をもたらす。それぞれの部位のリン酸化は、異なる酵素に依存しており、C 部位は Csk という酵素によって特異的にリン酸化され、A 部位はその SFK 自身によって自己リン酸化される。C 部位リン酸化による酵素活性の阻害効果は、図 2-B に示すようにリン酸化された C 部位が同一分子内の SH2 領域と結合することで、酵素活性中心を閉じた立体構造を作るためであると考えられている。逆に A 部位のリン酸化は、活性中心を開いた状態に維持するため必要となるとされている (図 2-C)<sup>7-9)</sup>。以上の図式を考察すればお分かりの通り、興味深いことに SFK は一分子内に盾と矛を有している分子であると言える。つまり、チロシン脱リン酸化酵素は理論的に、C 部位の脱リン酸化により SFK 酵素活性を上げる働き、もしくは A 部位の脱リン酸化により SFK 酵素活性を下げる働きの両者が共存することになる。後述するように盾と矛が共にリン酸化されている (図 2-D) とトータルの活性はどうなるのか？はたまた、共に脱リン酸化された状態 (図 2-E) での活性はどのようになっているのかについて、これまであまり議論されてこなかった。しかし、これらの状態におけるリン酸化酵素活性状態を理解しなければ、SFK の活性制御の本当の理解にはたどり着けないと私は考えている。因みに、我々の実験で導き出した答えは、図 2-D の状態は、活性化状態であり、図 2-E の状態は不活性化状態であった。

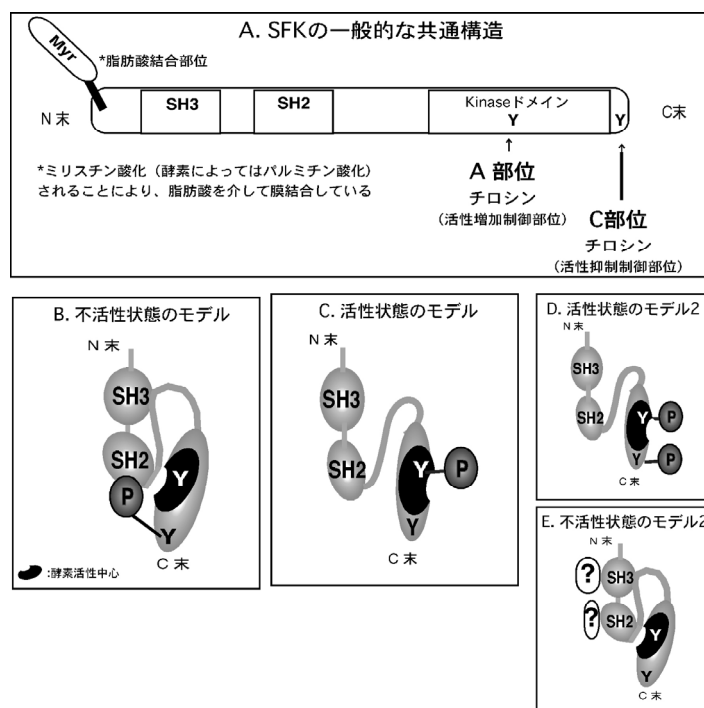


図2. サークファミリーキナーゼ (SFK) の構造モデル

SFKは共通構造としてN末端側から脂質結合部位、SH3、SH2を各一つずつ、次いでC末端側に酵素活性ドメイン (kinase domain) を持つ。SFKには、Lck, Fyn, Blk, Hck, Yes等が含まれるがいずれもこの共通構造を踏襲しており、分子量もほぼ60kDa前後である。さらに、SFKには興味深い特徴がある。いずれの酵素も kinase domain中に2つの酵素活性制御チロシンを持っているのである。C末端付近存在するチロシン残基はその分子の持つ酵素活性を抑制的に制御する。本稿ではC部位とする。一方、kinase domain中央には、酵素活性をオンするためのチロシン残基が存在する。SFKが酵素活性を発揮するためには事実上この部位がリン酸化されている必要がある。この部位はその酵素自身によって自己リン酸化される部位であるため、自己リン酸化部位と一般に呼ばれるが、本稿ではA部位と略した図2-A。左図中Bに示すように不活性化状態のSFKは、C部位のリン酸が同一分子内のSH2に結合した状態にあるため活性中心が立体構造的に閉じた状態である。一方、A部位がリン酸化された状態では、活性中心が開く。SFKは、これらのリン酸化状態による分子構造の変化のために酵素活性のOFF/ONが起こる。ところが近年、SFKが細胞内に取りうる構造は上記の2パターンのみでなく、左図中DやEに示したリン酸化状態が存在することが示され、SFK活性の細胞内制御は当初考えられていたより複雑であることが明らかになってきた。

### 3. スイッチボックスで SFK の活性制御を担う CD45 の構造と機能

スイッチボックスを構成する分子群で SFK の活性制御を直接担う分子として長く研究されてきたチロシン脱リン酸化酵素と言え、真っ先に CD45 が挙げられる<sup>10-12)</sup>。そして近年では、CD45 の他にいくつかスイッチボックス制御に重要なチロシン脱リン酸化酵素が登場してきた。例えば、SFK の活性抑制に重要な役割を担う分子としてポジションが確立してきた細胞内型の脱リン酸化酵素である SHP-1 や SHP-2、さらに、つい最近では、CD45 と近い役割を持つことが示唆されている CD148 など、興味深い脱リン酸化酵素の研究報告が蓄積し始めた<sup>13)</sup>が、これら分子の最新の役割については、まだ多数の研究者の統一見解は得られていない状況であるので、文献 13 に挙げた 2012 年のアンドレ・ビエレッタらの優れた総説にまかせて本稿では触れず、ある程度理解が固まってきた CD45 に注視していくことにする。

チロシン脱リン酸化酵素の代表である CD45 は、白血球およびリンパ球表面に豊富に発現しており、旧来「白血球共通抗原(=LCA)」と呼ばれてきた。CD45 は細胞内に 2 つの PTP ドメインをタンデムに持ったレセプター型のチロシン脱リン酸化酵素、すなわち PTP(=protein tyrosine phosphatase)として機能する。ただし、実際に 2 個の PTP ドメインのうち脱リン酸化酵素活性を示すのは N 末側の PTP ドメインであるとされている。C 末側 PTP ドメインは基質との結合や脱リン酸化酵素活性の制御に関与しているのではないかと考えられている<sup>10-12)</sup>。CD45 の構造モデルを図 3 に示した。

先に挙げた SFK の活性制御メカニズムが詳細に解析されているのに比べて、CD45 分子の脱リン酸化酵素活性の制御機構については、実際のところあまり分かっていないとするのが無難であろう。例えば、Csk が CD45 の 1193 番目のチロシンをリン酸化することにより PTP 活性を増強するという報告がある<sup>12)</sup>。Csk は SFK の活性を抑制する酵素である。しかし、その後、同様の結果は報告されていない。また、近年提出されている「ウェッジモデル」は大変魅力的なモデルではある。このモデルによれば CD45 は二量体化(dimerization)することで相互に酵素活性を抑制する。その分子機構は、CD45 の膜貫通部位直下に存在するアミノ酸配列ループ(ウェッジ)が互いに立体干渉することで、相互の PTP 活性を阻害するとしている<sup>15-17)</sup>。既に PTP $\alpha$ においてこのような二量体化による活性抑制機構が報告されており<sup>18)</sup>、これについては専門家のコンセンサスが得られている。また、レセプター型のチロシンリン酸化酵素が二量体化により、互いをリン酸化して活性化するという広く受け入れられている機構ときれいな対称を示すモデルでもあるため、広くチロシン脱リン酸化酵素に共通する活性制御機構だと提唱者達(アート・ワイスら)は宣伝している<sup>15-17)</sup>。ただし、CD45 を化学的に架橋した後でないと二量体化が観察されないなど実験系が人工的条件であること、また詳細な CD45 の立体構造の物理化学的裏付けが不十分なまま、漠然と受け入れられているのが現状であり、CD45 におけるウェッジ制御モデルは今後注意深く検証される必要がある<sup>13)</sup>。

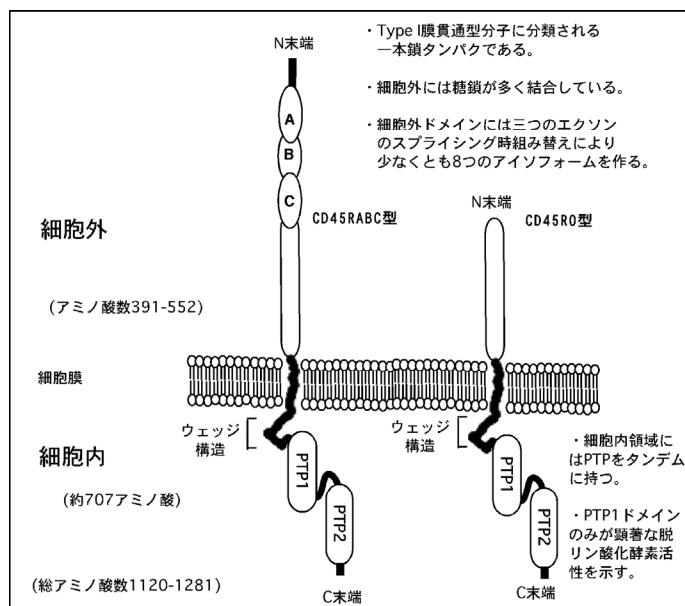


図3 CD45の構造

CD45は膜結合型のチロシン脱リン酸化酵素 (PTP) である。細胞外ドメインはそのユニークな構造が各種免疫担当細胞のマーカーとなる。図には、B細胞マーカーとなるB220とも呼ばれる。CD45RABC型を右に記した。また、マクロファージなどのマーカーともなるCD45R0型を右に記した。これらはN末端の構造だけが異なっている。細胞内の2個のPTPのドメインの内、顕著な脱リン酸化活性を持つのはPTP1である。細胞膜直下にはウェッジ構造と呼ばれるループがあり、多くのPTPでは、細胞内で分子が二量体を形成する際、互いにパートナー分子のPTPドメインの活性中心を立体構造的に覆うことにより、互いに不活性化しあうというモデル (ウェッジモデル) が提唱されている。ただし、CD45は、このモデルはあてはまらないという報告もある。いずれにせよCD45は膜結合型PTPとしては最も古くから研究されているPTP分子であるが、細胞外部分に対するリガンドもまだまだ不明であり、ウェッジループのみならず細胞内PTPが果たす役割についても未解明な点が多い。

#### 4. 実際の生体内における CD45 と SFK の関係は単純ではない

さて、T細胞抗原受容体やB細胞抗原受容体シグナルの初期にそれぞれ SFK である Lck と Lyn の活性化が必須であること、CD45 がT細胞とB細胞上に豊富に存在すること、そして、実験室レベルで細胞を可溶化して取り出した CD45 の実験系において CD45 が SFK を直接の基質としてキナーゼ活性を上昇させることから、生きた細胞内における CD45 のシグナルの制御機構が憶測されてきた<sup>10-13)</sup>。

実際、いくつかの生きた細胞における実験系で CD45 が SFK の C 末のキナーゼ活性抑制部位のリン酸化チロシンを脱リン酸化することで SFK の酵素活性を上昇させることが報告されており<sup>19, 20)</sup>。先述のタンパク質抽出液レベルでの実験結果と相まって、現在も多くの教科書がこの理論のみを掲載している (図 4-A)。このため、CD45 の生きた細胞における役割の詳細な検証はほとんど行われなかった。しかし、論理的に考えれば、SFK の A 部位の脱リン酸化は、活性抑制効果があるはずであり、生理的条件下において CD45 は SFK の活性を時と場合によって、上げることも下げることもあり得ることが、近年やっと明らかになってきた。すなわち、図 4 に示すようなメカニズムで CD45 欠失によって SFK 活性は増強される場合と抑制される場合があるという結果が蓄積されてきたのである (図 4-B)<sup>21-30)</sup>。

我々も CD45 欠失B細胞株を作製し、親株と Lyn の酵素活性を比較解析した結果、CD45 欠失細胞で Lyn の活性が上昇していることが明らかにした<sup>28-30)</sup>。興味深いことに未熟B細胞株 WEHI-231 より樹立した CD45 欠失クローンは Lyn 活性のみが上昇しており、他の SFK (Lck B1k) の活性変化は認められなかった。他方、成熟B細胞 BAL-17 より樹立した CD45 欠失クローンでは、Lyn の特異的活性変化は認められず、Fyn のみに酵素活性上昇が観察された。このような、相反する CD45 の働きについては、T細胞抗原受容体シグナルについても報告されている<sup>25-27)</sup>。

我々の結果と他の報告を併せて導き出される結論は、二つある。一つは、SFK と単純に同一グループに分類されるとはいえ、CD45 は、生理的条件下で特定の SFK を優先的にターゲットとすること。そして、生き

た細胞中では「CD45 は SFK 活性を抑制させる」場合が多いという事実である。この結果は、CD45 のエクソン 9 をノックアウトしたマウス (KO マウス) の実験結果からも支持される。このマウスでは T 細胞において Lck 活性の上昇が観察されたことが報告されている<sup>31, 32)</sup>。また、我々も CD45KO マウスの脾臓 B 細胞において Lyn の活性が上昇していることを確認した<sup>33)</sup>。

CD45 の特定 SFK 活性抑制の分子メカニズムとしては、先に示した自己リン酸化部位のチロシン脱リン酸化が重要であることが、我々およびアッシュウェルのグループにより確認されている<sup>26, 27)</sup>。

他方、SFK の一員である Hck の物理化学的立体構造が解明されている。この結果においても、Hck の C 部位リン酸化とその SH2 への結合は確かに酵素活性抑制コンホメーションの安定化に寄与はしているが、それは決定的な条件ではないらしい。むしろ重要なのは SH2 と PTK ドメイン間にあるリンカー部分の SH3 への結合であることが示されている<sup>34, 35)</sup>。これは、SFK 活性が分子内のチロシンリン酸化以外の要因 (SH3 結合タンパク質など) によっても調節されることを予想させるものであるが、このような新たな因子 (SFK 結合タンパク質) が登場してくると、CD45 と SFK と Csk とさらに SFK 結合タンパク質…これらに加えて、CD45 の役割を一部代替する CD148 も加えて事態は混沌としてくる。事実は小説よりも奇なりというわけではないが、生きている細胞の活性化制御スイッチボックスは当初の予想よりかなり複雑らしい。

このように、「CD45= SFK の活性上昇に働く酵素」という一元的な考え方は、今や古典経路といえるだろう。最近の報告ではむしろ、生理的には、「CD45 が SFK 活性を抑制する」とする新規経路が重要であることを示している。また、最近 CD45 は、B 細胞および T 細胞の抗原受容体シグナルのみならず、サイトカイン受容体のシグナル制御に重要な役割を担う JAK キナーゼの活性をも制御することが報告されている<sup>36)</sup>。生体内で CD45 は時と場合により特定の SFK あるいは JAK や重要なターゲットを標的としてその活性を自在に操り、八面六臂の活躍をしているということなのであろう。今後、重要な問題となるのは CD45 がいつどのようにしてこれらカイネースの活性化と不活性化を使い分けるかというメカニズムの解析である。

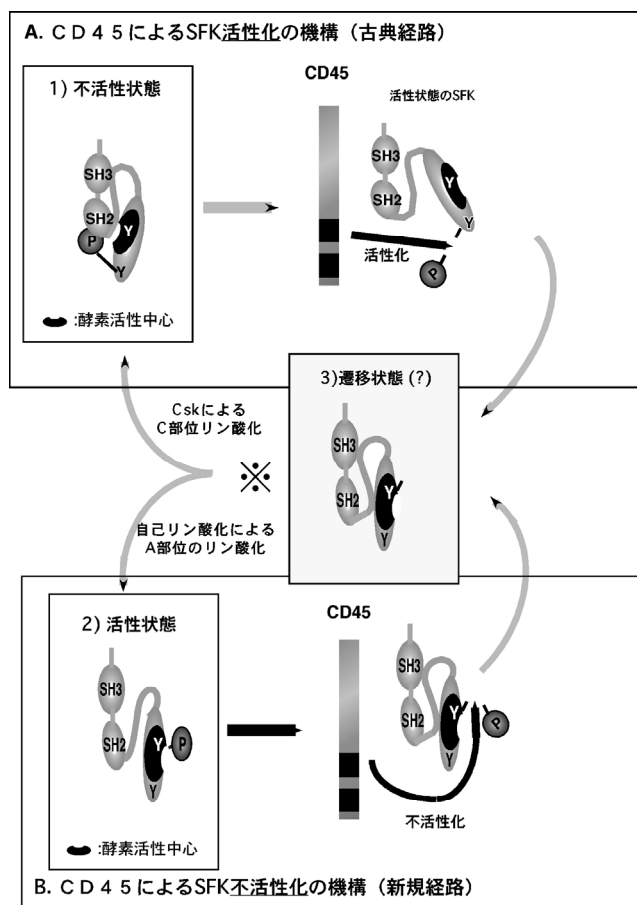


図4. CD45によるSFK活性化/不活性化の両方向モデル

A: 不活性化状態にあるSFK (図中1) は、抑制部位のリン酸がCD45によって脱リン酸化されることにより活性化される (図4上段)。  
B: 一方、活性化状態にあるSFK (図中2) は、CD45による活性化部位の脱リン酸化で酵素活性は抑制される (図4下段)。

既存の教科書では、Aの古典経路が主に説明されてきたが、近年、Bに示す経路によりCD45がSFKの活性を抑制することが明らかになった。注目すべきは、CD45によるSFK活性化・不活性化どちらの場合も、理論上産生されるSFKは、一時的に3)の状態を経由する (図4中段) ことであり、※の時点で、細胞内の状態 (Cskの強い状態or自己リン酸化の強い状態) によってその後の酵素活性は、大きく異なる点である。つまり、CD45によるSFK活性のコントロールが正に働くか、負に働くか (図中A or B) は、細胞内のコンディションによって大きく異なる。

## 5. 細胞膜ラフトはCD45のシグナル制御機構の鍵となるはずだが…

さて、話を戻して抗原受容体シグナルの発火機構においてCD45によるSFK活性制御機構はどのようなものなのだろうかについて、もう少し詳細に眺めてみよう。CD45とSFKの相互作用はそれだけでなく複雑なようではあるが、とりあえず、両者が物理的にいつ出会い、いつ別れるのかを探る上で、我々は、細胞膜ラフトがこの機構解明の鍵ではないかと考えた。ラフトとは、細胞膜の脂質二重層に不均一分布するスフィンゴ糖脂質やコレステロール豊富に含まれる生化学的に同定された構造であったが、共焦点顕微鏡技術と膜の微細構造を蛍光色素で染色する技術の進歩が相まって近年注目されている細胞膜構造である。脂質二重膜の海に漂う筏 (いかだ) をイメージさせる構造体と考えられるために筏構造 (ラフト) と呼ばれる。ラフトでは、この構造成分である丸太ならぬ会合タンパク質の種類、および量がダイナミックに変化することが明らかとなっている<sup>37, 38)</sup>。そして、ラフトは種々の受容体のシグナル発信もしくはシグナル集結の場となっているという報告が蓄積されている<sup>39-41)</sup>。

実際、我々はB細胞抗原受容体においてもコレステロールを除去する薬剤でラフトを破壊するとシグナルは認められなくなること、つまり、スイッチボックスが破壊された状態になることを見いだしている<sup>30)</sup>。SFKの一つであるLynはB細胞抗原受容体刺激の有無にかかわらずラフトに局在していることはすでにコンセンサスが得られており、表面Ig-M分子はBCR刺激直後よりラフトに集積する<sup>30)</sup>。このような抗原受容体シグ

ナル発信のプラットフォームとしてもラフトが重要であるという報告が蓄積する<sup>42-44)</sup>一方で、CD45 とラフトの関係はいかなるものであろうか？

B細胞の抗原受容体の複合体中に CD45 が会合しているという結果は以前から報告されていた<sup>45)</sup>。しかし、1999 年と 2000 年スーザン・ピアスらは、B細胞ラフトに CD45 が局在しないと報告した<sup>46, 47)</sup>。しかし、その時点で我々は、細胞に発現している CD45 の少なくとも 1〜5 パーセントが B細胞抗原受容体ラフトに局在していることを観察していた。しかも、大変興味深いことに BCR 刺激直後に CD45 がラフトから解離するという結果を得ていた。そして、この解離のタイムコースは Lyn の活性化および種々のタンパク質のチロシンリン酸化カスケードに先立っていた<sup>30)</sup>。我々の結果は、無刺激状態における B細胞抗原受容体ラフトに会合状態の CD45 が Lyn 活性の抑制に寄与しており、刺激直後のラフトからの解離により、Lyn 活性化の引き金が、すなわち BCR シグナルの発火を誘導していると考えられる(図 5)。実際、人工的な条件で CD45 をラフトに局在化させると抗原受容体シグナルは発火しなくなることが報告されている<sup>48)</sup>。我々のモデルは自画自賛ながら大変美しく感じられる。

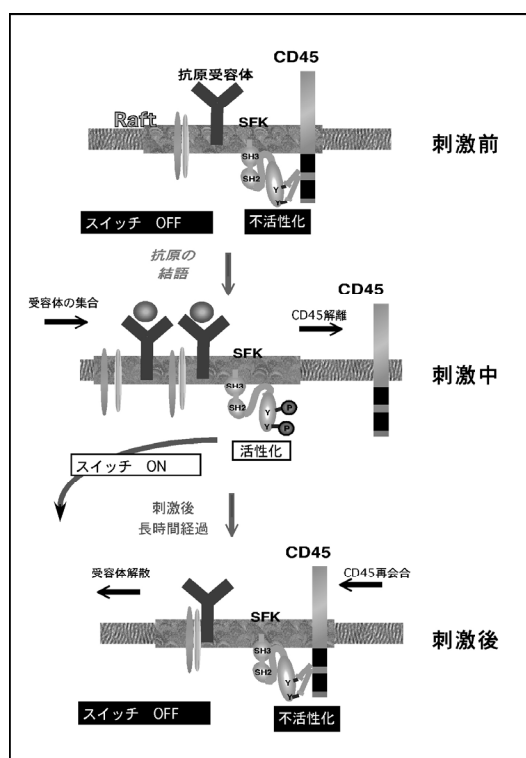


図5. ラフトへのCD45会合／解離によるシグナルスイッチOFF/ONモデル

我々の考えるモデルでは、抗原受容体ラフト上にわずかに存在するCD45は、SFK活性抑制機構(新規経路)を使ってシグナルが自然発火するのを抑止している。抗原刺激があると、CD45はラフトから解離し、SFKは発火してシグナルを発信する。一度、シグナルを発信した後には何時までも活性化は継続する必要はない。そのため、CD45は再び過剰にラフトに会合して SFKの活性を抑制して沈静化させる。

それでは、我々と相反する結果を提出しているピアスらと我々の結果の違いが何によるものか、もちろん今後詳細な検討が必要であるがラフトを生化学的に分離する技術は非常に微妙であり、また、彼らは非常に特殊な BCR 刺激の実験系を用いていることなどが結果の違いとなって現れている可能性がある。残念ながら我々のモデルは、当初(ピアスらの報告直後)、一般になかなか受け入れられなかった。CD45 がラフトとダイナミックに会合/分離し、それが SFK の活性化/不活性化と見事にシンクロする結果が出た時、我々は勇んで Nature に投稿したのであるが、結果はとりつく島もないものであった。ところがところが、その直後、T細胞



胞における報告でT細胞抗原受容体(TCR) ラフトには細胞表面全 CD45 の数%が局在していること<sup>49, 50)</sup>、T細胞抗原受容体シグナルにその局在が重要であること、そして、少なくともT細胞株ではT細胞抗原受容体刺激とともにCD45はラフトから解離することが示された。文献50に挙げたNature Immunologyに掲載された報告がそれである。そして、つい最近、B細胞においても、共焦点顕微鏡を用いた解析で細胞表面の全CD45のおよそ5%がBCR ラフトに局在しており、刺激後30分ではより多くのCD45がラフトに集積するという結果が報告された<sup>51)</sup>。どうやら、ようやく、CD45の少なくとも一部が抗原受容体ラフトに存在するというわれわれの結果が市民権を得てきたようだ。ただ、やはり微妙に揺れ動く細胞膜の刹那的な構造を再現よく丁寧解析するのは、難しいらしく、我々が普通に再現できるデータも海外の研究室では、結果がばらつくところとこぼされる。安定して細胞膜ラフトを観察することの出来る技術が別領域で育ってくるのを待つまで、ラフトスイッチボックス仮説が一般にコンセンサスを得られるまでの道のりは平坦ではないようだ。

しかし、周りの技術進歩を安閑と待つてはいられない。次なるポイントは、抗原受容体とラフトのCD45会合状態のダイナミクスである。現在、この問題は各報告により混沌とした状態になっている。我々はB細胞抗原受容体刺激直後数10分後には、DeFrancoらの報告<sup>51)</sup>と同じく、無刺激時以上のCD45がラフトに会合することを観察している。これは、B細胞抗原受容体シグナル終了時にCD45がラフトのLyn活性を停止させるために復帰したと考えることができる。したがって、もっとも重要なポイントは、抗原受容体刺激直後、Lyn活性化が観察されるB細胞抗原受容体刺激後、数十秒～数分の時点におけるラフト会合CD45の挙動であり、今後注意深く検討されなければならない。

## 終わりに

この原稿を2012年日本癌学会総会開催地である札幌の地で、ホテルの一室で書かざるを得ない状況となってしまった。ホテルの一室でテレビのリモコンを片手にニュースを聞きながら原稿の推敲をする。このリモコンスイッチはよくできているものだ。癌学会は優れた研究者の集会ではあるが、このリモコンのボタンがテレビを起動し、ボリュームを上下でき、チャンネルを変えられるメカニズムを説明できるヒトは何人もないであろう。免疫学者がやろうとしていることは、細胞のスイッチのメカニズムの解明である。残念ながら私たちは、まだ、免疫スイッチボックスのメカニズムについては、まともに操作することも出来ない現状である。しかし、この箱の中の主要なパーツとして、リン酸化酵素と脱リン酸化酵素の相互作用があることだけは、現時点でも確実に言えるところではある。リン酸化される分子、リン酸化酵素、そして、脱リン酸化酵素の三者の複雑な相互関係が生きている細胞内の限られた空間の中で、偶然と必然が織りなす時間軸の上でどのように整然と機能しているのか？我々の挑戦はまだ続くのである。

## 参考文献

1. Samelson LE. Immunoreceptor signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(12).
2. Tomlinson MG, Lin J, Weiss A. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. Immunol Today 2000; 21: 11.
3. Berry R, Chen Z, McCluskey J, Rossjohn J. Insight into the basis of autonomous immunoreceptor activation. Trends Immunol. 2011;32(4):165-70.
4. Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. Annu. Rev. Immunol 1999;17:555.
5. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. Annu Rev Immunol. 1999;17:931-72.
6. Bezbradica JS, Medzhitov R. Role of ITAM signaling module in signal integration. Curr Opin Immunol. 2012;24(1):58-66.
7. Cooper JA & Howell B. The when and how of Src regulation. Cell 1993;73:1051.
8. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. Oncogene. 2004;23(48):7990-8000.
9. Xu W, Harrison SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. Nature 1997;387:595.
10. Justement LB. The role of CD45 in signal transduction. Adv. Immunol. 1997;66:1.
11. Yakura H. Phosphatases and kinases in lymphocyte signaling. Immunol. Today. 1998;19:198.
12. Ashwell JD & D'Oro U. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. Immunol. Today 1999;20:412.
13. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. Nat Immunol. 2012;13(5):439-47.
14. Autero M, Saharinen J, Pessa-Morikawa T, et al. Tyrosine phosphorylation of CD45 phosphotyrosine phosphatase by p50 csk kinase creates a binding site for p56 lck tyrosine kinase and activates the phosphatase. Mol Cell Biol 1994;14:1308.
15. Majeti R, Bilwes AM, Noel JP, et al. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. Science. 1998;279:88.
16. Majeti R, Xu Z, Parslow TG, et al. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. Cell. 2000;103:1059.
17. Xu Z & Weiss A. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. Nat Immunol. 2002;3:764.
18. Bilwes AM, den Hertog J, Hunter T, et al. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- $\alpha$  by dimerization. Nature. 1996;382:555-559.
19. Cahir McFarland ED, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, et al. Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through T-cell

- receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993;90:1402.
20. Yanagi S, Sugawara H, Kurosaki M, et al. CD45 modulates phosphorylation of both autophosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells. J. Biol. Chem. 1996;271:30487.
  21. Thomas ML, Brown EJ. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. Immunol. Today. 1999;20:406.
  22. Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. Semin. Immunol. 2000;12:349.
  23. Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, et al. CD45: new jobs for an old acquaintance. Nat. Immunol 2001;2:389.
  24. Burns CM, Sakaguchi K, Appella E, et al. CD45 regulation of tyrosine phosphorylation and enzyme activity of *src* family kinases. J. Biol. Chem. 1994;269:13594.
  25. D'Oro U, Sakaguchi K, Appella E, et al. Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: Dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity. Mol. Cell. Biol. 1996;16:4996.
  26. D'Oro U & Ashwell JD. The CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. J. Immunol. 1999;162:1879.
  27. Ashwell JD & D'Oro U. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. Immunol. Today 1999;20:9.
  28. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Mizuno K, Yakura H. Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells. J. Biol. Chem. 1995;270:27987.
  29. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Arimura Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K, Yakura H. CD45 negatively regulates Lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. J. Immunol. 1999;163:1321.
  30. Shrivastava P, Katagiri T, Ogimoto M, Mizuno K, Yakura H. Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells. Blood. 2004;103(4):1425-32.
  31. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, et al. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and in B cell maturation. J. Exp. Med. 1996;183:1707.
  32. Baker M, Gamble J, Tooze R, et al. Development of T-leukaemias in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mutant lck mice. The EMBO J. 2000;19:4644-4654
  33. Holmes N. CD45: all is not yet crystal clear. Immunology. 2006 Feb;117(2):145-55.
  34. Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. Nature. 1997;385:602.
  35. Young MA, Gonfloni S, Superti-Furga G, et al. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. Cell. 2001;105:115-126

36. Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, et al. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat. Immunol.* 2001;2:389.
37. Simons K & Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387:569.
38. Simons K & Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:31.
39. Harder T. Raft membrane domains and immunoreceptor functions. *Adv. Immunol.* 2001;77:45.
40. Brdicka T, Pavlistova D, Leo A, et al. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J. Exp. Med.* 2000; 191:1591.
41. Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, et al. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature.* 2000;404:999.
42. Parikh K, Poppema S, Peppelenbosch MP, Visser L. Extracellular ligation-dependent CD45RB enzymatic activity negatively regulates lipid **raft** signal transduction. *Blood.* 2009;113(3):594-603.
43. Nika K, Tautz L, Arimura Y, Vang T, Williams S, Mustelin T. A weak Lck tail bite is necessary for Lck function in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(49):36000-9.
44. Drbal K, Moertelmaier M, Holzhauser C, Muhammad A, Fuertbauer E, Howorka S, Hinterberger M, Stockinger H, Schütz GJ. Single-molecule microscopy reveals heterogeneous dynamics of lipid raft components upon TCR engagement. *Int Immunol.* 2007;19(5):675-84.
45. Brown VK, Ogle EW, Burkhardt AL, et al. Multiple components of the B cell antigen receptor complex associate with the protein tyrosine phosphatase, CD45. *J. Biol. Chem.* 1994;269:17238.
46. Cheng PC, Dykstra ML, Mitchell RN, et al. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* 1999;190:1549.
47. Sproul TW, Malapati S, Kim J, Pierce SK. B cell antigen receptor signaling occurs outside lipid rafts in immature B cells. *J. Immunol.* 2000;165:6020.
48. Rodgers W & Rose JK. Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J. Cell Biol.* 1996;135:1515.
49. Edmonds SD & Ostergaard HL. Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes. *J. Immunol.* 2002;169:5036.
50. Irles C, Symons A, Michel F, Bakker TR, et al. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat. Immunol.* 2003;4:189.
51. Gupta M & DeFranco AL. Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol. Biol. Cell.* 2003;14:432